

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) BG

(11) 63614 B1

7(51) A 23 C 9/00
A 23 C 9/123



ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 103668 (22) Заявено на 18.08.99 (24) Начало на действие на патента от: Приоритетни данни			(73), (72) Патентоприитежател(и) и изобретател(и): ИВАН ДИМОВ МУРГОВ ЗАПРЯНА РАНГЕЛОВА ДЕНКОВА ПЛОВДИВ		
(31)	(32)	(33)			
(41) Публикувана заявка в бюлетин № 4 на 28.04.2001 (45) Отпечатано на 31.07.2002 (46) Публикувано в бюлетин № 7 на 31.07.2002 (56) Информационни източници:			(74) Представител по индустриална собственост:		
(62) Разделена заявка от рег. №			(86) № и дата на РСТ заявка:		
			(87) № и дата на РСТ публикация:		

(54) МЕТОД ЗА ПОЛУЧАВАНЕ НА ПРОБИОТИЦИ

(57) Методът ще намери приложение за профилактика и лечение на диарии, стомашно-чревни инфекции и дисбактериози при хора и животни, както и за регулиране нивото на холестерола и за укрепване на имунната система. Лиофилизирани и стандартизирани продукти се прилагат като препарати за пряко използване и като закваски за приготвяне на ферментирани киселомлечни продукти с пробиотично действие. По метода се получават пробиотици с висок титър на живи активни клетки на смесени и симбиотични култури от селектирани шамове на лактобацили и стрептококи *Lactobacillus* LAB 8, регистриран в НБПМКК под № 2416, *Lactobacillus* LBC 7, регистриран в НБПМКК под № 3599, *Lactobacillus* LBG-MZ, регистриран в НБПМКК под № 3600, *Lactobacillus bulgaricus* LB 51-157, регистриран в НБПМКК под № 3598, *Streptococcus thermophilus* 35, регистриран в НБПМКК под № 3597 и *Bifidobacterium bifidum* BB 87, регистриран в НБПМКК под № 3601.

I претенция

BG 63614 B1

(54) МЕТОД ЗА ПОЛУЧАВАНЕ НА ПРОБИОТИЦИ

Област на техниката

Изобретението се отнася до метод за получаване на пробиотични препарати за профилактика и лечение на диарии, стомашно-чревни инфекции и дисбактериози при хора и животни.

Предшестващо състояние на техниката

Известни са методи за получаване на пробиотици, в състава на които са включени представители на лактобацили, лактококи, гъби и други микроорганизми, развиващи се аеробно или анаеробно в мляко, млечни и растителни субстрати и среди, съдържащи въглехидрати, източници на азот и фосфор, минерални елементи и растежни фактори /1, 2, 3, 7, 10/. Характерна особеност на пробиотичите е, че съдържат живи активни клетки, които чрез своите метаболити и жизнено действие спомагат за регулиране на стомашно-чревната микрофлора.

Известно е диетичното и лечебно действие на българския йогурт, ацидофилното и бифидното мляко, в които влизат различни представители на лактобацили и лактококи, способни да се развиват в стомашно-чревния канал и да продуцират млечна киселина и бактериоцини, чрез които потискат патогенните и гнилостните бактерии-причинители на чревни инфекции, диарии и други нежелани за организма процеси, като дисбактериози при хора и животни, понижават нивото на холестерола и укрепват имунната система /3, 4, 7, 8, 9, 10/.

Техническа същност на изобретението

Същността на изобретението е метод за получаване на пробиотици с висок титър на жизнеспособни активни клетки, в състава на които са включени хибридният щамове на лактобацили *Lactobacillus* LAB 8, *Lactobacillus* LBC 7 и *Lactobacillus* LBG-MZ. Последните са получени по метода на генетичната рекомбинация чрез фузия на протопласти /3/ и имат висока размножителна способност, натрупват висок титър клетки и

имат висока инхибиторна активност спрямо ентеропатогенни бактерии. Рекомбинантните щамове се развиват еднакво добре като монокултури и в симбиотични култури с други лактобацили и лактококи и се използват за получаване на пробиотици и ферментирали млечни продукти с високо съдържание на жизнеспособни клетки, имащи пробиотично действие.

В метода за получаване на пробиотици се използват като продуценти: *Lactobacillus* LAB 8, регистриран в НБПМКК под № 2416 и получен чрез фузия на протопласти на клетки на *Lactobacillus acidophilus* 12 и *Lactobacillus bulgaricus* 10; *Lactobacillus* LBC 7, регистриран в НБПМКК под № 3599 и получен чрез фузия на протопласти на *Lactobacillus bulgaricus* 144 и *Lactobacillus casei*-C; *Lactobacillus* LBG - MZ, регистриран в НБПМКК под № 3600 и получен чрез фузия на протопласти на *L. bulgaricus*-Z и *L. bulgaricus*-M.

Щамове *Lactobacillus bulgaricus* LB51-157, регистриран в НБПМКК под № 3598, *Bifidobacterium bifidum* BB 87, регистриран в НБПМКК под № 3601, и *Streptococcus thermophilus* 35, регистриран в НБПМКК под № 3597, са получени чрез индуцирана мутагенеза с нитрозометилгуанидин върху съответните родителски култури.

Според Donald и Brown /6/, за да изпълняват ролята на пробиотици, препаратите трябва да съдържат в 1 g продукт над 1 билион жизнеспособни клетки, което се счита като норма за човешкия организъм при балансиране на стомашно-чревната микрофлора.

Задачата на изобретението е получаването на пробиотични препарати с висок титър на жизнеспособни клетки на смесени или симбиотично развиващи се култури на посочените щамове лактобацили и лактококи в мляко, млечни, соеви и други среди на растителна основа.

Висока активност на пробиотичите се постига за сметка на използване на селектираните щамове, имащи съответните свойства от една страна и за сметка на високата размножителна способност и натрупването на клетки с висок титър в средата и тяхното концентриране чрез микрофилтрация или сепариране, от друга страна /1, 3/.

В получаваните концентрати титърът на лактобацилите и на лактококите надхвърля 10^{13} cfu/g, които след лиофилизацията практически съхраняват своята жизнестойност и активност.

Изобретението се отнася до получаването на пробиотични препарати с високо съдържание на активни клетки на смесени и симбиотично развиващите се шамове лактобацили и лактококи: *Lactobacillus* LAB 8, *Lactobacillus* LBC 7, *Lactobacillus* LBG-MZ, *Lactobacillus bulgaricus* LB 51-157, *Streptococcus thermophilus* 35 и *Bifidobacterium bifidum* BB 87.

Настоящият метод включва култивиране на посочените селектирани шамове на лактобацилите и лактококите в млечна или соева среда, последващо концентриране и лиофилизация. Препаратите, получени в среди на основа соеви субстрати, позволяват прилагането им за профилактика и лечение на диарии, стомашно-чревни инфекции и дисбактериози при хора, страдащи от лактазна недостатъчност /5/.

Изобретението може да се илюстрира със следните примери.

Пример 1. Стерилно обезмаслено и охладено до $37-40^{\circ}\text{C}$ мляко се засява с 1% 24-часова култура на развити симбиотично *Lactobacillus* LAB 8, *Lactobacillus* LBC 7 и *Streptococcus thermophilus* 35. Култивира се при 37°C за 10 h. Млякото се изважда от термостата, охлажда се до $4-6^{\circ}\text{C}$ и се центрофугира. Полученият концентрат се замразява и се суши под вакуум (лиофилизира). Сухият продукт представлява концентрат с висок титър жизнестойни клетки, превишаващи 10^{12} cfu/g.

Пример 2. Приготвя се соев екстракт със съдържание на сухи вещества 3%, към който се прибавят 3,5% глюкоза или захароза. Така приготвената среда се стерилизира при 121°C за 15 min. Охлажда се до $37-40^{\circ}\text{C}$ и се посява самостоятелно с 1% 24-часова култура на *Lactobacillus bulgaricus* LB 51-157 и *Lactobacillus* LAB 8. Култивира се при $40-42^{\circ}\text{C}$ 12-14 h, след което се внасят в количество 2-5% във ферментационната среда, която съдържа соево брашно, глюкоза или захароза. Процесът се води при посочената температура в течение на 18-24 h. Клетки-

те се отделят и се сушат чрез лиофилизация. Сухият концентрат съдържа над 10^2 cfu/g жизнестойни клетки.

Пример 3. Стерилна ферментационна среда (обезмаслено мляко или соева среда), както е описано в примери 1 и 2, се посява с 1% 24-часова симбиотична култура на *Lactobacillus* LAB 8, *Lactobacillus* LBG-MZ и *Streptococcus thermophilus* 35. Култивира се 7-8 h при $40-42^{\circ}\text{C}$. След това ферментационната среда се охлажда до $4-6^{\circ}\text{C}$, концентрира се и се подлага на лиофилизация. Сухият лиофилизиран продукт съдържа над 10^2 cfu/g.

Пример 4. Стерилно обезмаслено мляко, към което са добавени 1% дрождев екстракт и 0,5% цистеин. HCL, се посява с 1% симбиотично развита култура на *Lactobacillus* LAB 8 и *Bifidobacterium bifidum* BB 87. Култивира се при 37°C за 12-16 h. Културалната среда се охлажда до $4-6^{\circ}\text{C}$, сепарира се и се подлага на лиофилно сушене.

Пример 5. Леофилизираният препарат се стандартизира и със съдържание на живи активни клетки над 10^{10} cfu/g се капсулира или таблетира по 250, 400 и 500 mg. Дава се профилактично или лечебно по 2-6 броя на ден в течение на 3-10 дни в зависимост от потребностите на пациента.

Пример 6. Леофилизиран пробиотик със съдържание на активни живи клетки над 10^{10} cfu/g след разтваряне в преварено мляко или вода се дава на бозайници непосредствено след раждане за профилактика на колиентерити и едемна болест, а също така лечебно при диарии, стомашно-чревни инфекции или дисбактериози в зависимост от потребностите на отделните пациенти.

Патентни претенции

1. Метод за получаване на пробиотици, включващ култивиране на смесени или симбиотични култури на шамове от родовете *Lactobacillus* и *Streptococcus* в хранителни среди, съдържащи млечни и соеви субстрати, въглехидрати, минерални елементи и растежни фактори с последващо концентриране и лиофилизация, характеризира се с това, че като продуценти се използват *Lactobacillus* LAB 8, регистриран в НБПМКК под № 2416, *Lactobacillus* LBC 7, регистриран в НБПМКК под № 3599, *Lactobacillus* LBG-MZ, регистри-

ран в НБПМКК под № 3600, *Lactobacillus bulgaricus* LB 51-157, регистриран в НБПМКК под № 3598, *Bifidobacterium bifidum* BB 87, регистриран в НБПМКК под № 3601, и *Streptococcus thermophilus* 85, регистриран в 5 НБПМКК под № 3597.

Литература

1. Банникова, Л. и др., 1987, Микробиологические основы молочного производства. 10 Агропромиздат, Москва.
2. Вейза, Д. А. Дж., Форстера, К. Ф., 1990, Экологическая биотехнология, Изд. "Химия", Ленинград.
3. BG 61799 B1. 15
4. Apella. C. et al., 1992, J. Appl. Bacteriol., 73 (6) 480-483.
5. Chun Yen Chang and Martha B. Stone, 1990. J. of food science, 55 (6), 1643-1646.
6. Donald, S. and Brown, N. D., 1993. Probiotics and the intestinal ecosystem, Let's live 44-47.
7. Gilliland, S. E., Walker D. U., 1990. J. Dairy Sci., 73, 905-911.
8. Link-Amster, H. et al., 1994. Immunology and Medical Microbiology, 73, 905-911.
9. Majaneaa, H., et al., 1997. J. Allergy Clin. Immunol., 99 (2), 179-185.
10. Shiitonen, S., et al., 1990. Ann. Med., 22 (1), 57-59.

Издание на Патентното ведомство на Република България
1113 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Ст. Стефанова

Редактор: А.Семерджиева

Пор. № 41491

Тираж: 40 СР